

## **ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO POR CEPAS DE *Lactobacillus* Y *Enterococcus* DE DISTINTOS ORÍGENES**

Carlos A. Conte-Junior y Silvia Soncin

Tutores: Eva Hierro Paredes y Manuela Fernández Álvarez

Dpto. de Nutrición, Bromatología y Tecnol. de los Alimentos. Fac. de Veterinaria. UCM

### **RESUMEN**

El ácido linoleico conjugado (CLA) incluye una mezcla compleja de isómeros del ácido linoleico con dobles enlaces conjugados. Existen numerosos estudios que relacionan las isoformas del CLA con distintos efectos beneficiosos en el organismo humano, como su actividad anticarcinogénica y antiaterogénica, la reducción de la grasa corporal o la mejora de la función del sistema inmune. Las bacterias del rumen son las principales implicadas en la producción de CLA, sin embargo existen también otros microorganismos capaces de producir CLA a partir de ácido linoleico, como cepas pertenecientes a los géneros *Bifidobacterium*, *Enterococcus* y *Lactobacillus*. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de cepas de *Lactobacillus* y *Enterococcus* aisladas de distintos orígenes en la producción de CLA para su posible utilización en alimentos funcionales. Los resultados del trabajo muestran que el principal isómero producido por todas las cepas estudiadas fue el *cis-9,trans-11*, y la cepa que produjo la mayor cantidad de CLA fue *Lactobacillus gasseri* LM21 cuando se incubó durante 48 horas en condiciones de anaerobiosis.

Palabras clave: ácido linoleico conjugado, CLA, *Lactobacillus*, *Enterococcus*.

### **ABSTRACT**

Conjugated linoleic acid (CLA) is a mixture of isomers of linoleic acid with conjugated double bonds. Several studies related the isoforms of CLA with beneficial effects such as anticarcinogenic activity, antiatherogenic activity, the ability to reduce body fat or to improve immune system function. Ruminal bacteria are the main responsible for CLA production. However other bacteria are also able to produce CLA from linoleic acid, such as *Bifidobacterium*, *Enterococcus* and *Lactobacillus* sp. The aim of this research was to evaluate the ability of several strains of *Lactobacillus* and *Enterococcus* isolated from different sources to produce CLA in order to use them for the production of functional foods. The results showed that the *cis-9,trans-11* CLA isomer was the dominant one in all the strains studied. *Lactobacillus gasseri* LM21 was the main producer when incubated in anaerobiosis for 48 hours.

Keywords: conjugated linoleic acid, CLA, *Lactobacillus*, *Enterococcus*.

## INTRODUCCIÓN

El gran interés actual por todo lo que se refiere a la relación entre alimentación y salud ha hecho de los alimentos funcionales un área en constante expansión en la industria alimentaria. Entre los numerosos compuestos con funciones biológicas específicas independientes de la nutrición básica que se pueden incorporar a los alimentos, cabe citar el ácido linoleico conjugado (CLA).

Bajo la denominación de CLA se incluyen diversos isómeros del ácido octadecadienoico (C18:2) con dobles enlaces *cis-trans*, que están presentes en productos lácteos y cárnicos derivados de rumiantes (Collomb *et al.*, 2006). El isómero predominante en estos productos es el ácido octadecadienoico *cis-9,trans-11* (Ogawa *et al.*, 2005) y deriva de los ácidos linoleico y  $\alpha$ -linolénico. Los distintos isómeros de CLA presentan diferentes efectos biológicos. Las isoformas más investigadas en relación con dichos efectos son el *cis-9,trans-11* (c9:t11) y el *trans-10,cis-12* (t10:c12). Diversos estudios en humanos relacionan el isómero t10:c12 con la reducción de la grasa corporal (Martin y Valeille, 2002) y con un efecto antidiabético (Khanal, 2004). Por otra parte, se está estudiando el papel del isómero c9:t11 en relación con el descenso de los niveles de colesterol en sangre (Tricon *et al.*, 2004), así como su efecto anticarcinogénico (Parodi, 2004).

Existen varias rutas metabólicas para la síntesis de CLA. La principal ruta comprende una secuencia de reacciones de isomerización, hidrogenación y desaturación a partir de los ácidos linoleico y  $\alpha$ -linolénico. Otra ruta posible es la síntesis del isómero c9:t11 a partir del ácido vaccénico (C18:1 *trans-11*) mediante desaturación. En los rumiantes, la síntesis de CLA tiene lugar por la primera ruta mencionada y se debe a la actividad de las bacterias del rumen, principalmente a *Butyrivibrio* sp. (Collomb *et al.*, 2006). Esta vía de síntesis no se produce en el organismo humano, aunque sí se ha demostrado la producción del isómero c9:t11 a partir del ácido vaccénico (Turpeinen *et al.*, 2002). También se ha visto que ciertas bacterias lácticas, sobre todo cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Enterococcus* pueden producir CLA (Alonso *et al.*, 2003; Ando *et al.*, 2003; Kim, 2003).

La principal fuente en la dieta de CLA para el ser humano es la grasa de los rumiantes. La ingesta diaria de CLA en los países occidentales se estima en 50-300 mg/día. Esta cantidad es menor que la que ha mostrado efectos beneficiosos en los estudios realizados en animales

(Turpeinen *et al.*, 2002). Por lo tanto, el aporte extra de este ácido graso con alimentos enriquecidos en los mismos puede contribuir a mejorar la ingesta diaria.

Las posibilidades de elaboración de alimentos funcionales enriquecidos en CLA incluirían la adición directa de este compuesto a los alimentos o la del microorganismo productor. El presente trabajo constituye un estudio de la capacidad de diversos microorganismos para producir CLA, con vistas a su posible inclusión en alimentos funcionales.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Se estudiaron 8 cepas bacterianas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Enterococcus* (Tabla 1). Las cepas revitalizadas se inocularon en caldo MRS con un 0,02% de ácido linoleico y un 1% de Tween 80 para facilitar su dispersión. Los medios se incubaron en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis a 37°C durante 24 y 48 horas.

Tras la incubación, los medios se centrifugaron a 8000 x g durante 10 minutos a 4°C para obtener los sedimentos y sobrenadantes correspondientes, que se utilizaron para estudiar la producción intra y extracelular de CLA, respectivamente. Los sedimentos se resuspendieron en tampón fosfato sódico 0,2M, pH 5,5 para proceder a la ruptura celular en un desintegrador. Tanto a los sobrenadantes como a los sedimentos se les añadió una solución de ácido heptadecanoico como estándar interno (Alonso *et al.*, 2003).

Las isoformas de CLA se extrajeron de los sedimentos y los sobrenadantes junto con todo el material lipídico de las muestras mediante una mezcla de disolventes siguiendo el método de Hanson y Olley (1963). El análisis de las distintas isoformas se llevó a cabo mediante cromatografía de gases. Para ello se procedió previamente a la metilación ácida de las muestras con un 10% de HCl 2N en un baño a 60°C durante 20 min (Chin *et al.*, 1992; Kishino *et al.*, 2002). Para el análisis cromatográfico se utilizó una columna Carbowax/BTR con un tamaño de partícula de 0,25  $\mu$ m y unas dimensiones de 0,32 mm x 30 m. La detección de los isómeros de CLA se llevó a cabo con un detector FID y la cuantificación se llevó a cabo mediante el método del estándar interno. Por lo que se refiere a las condiciones cromatográficas, tras un periodo inicial isoterma de 2 min a 140°C, se estableció un gradiente de 3°C/min hasta alcanzar 240°C, permaneciendo así la temperatura durante un período

adicional de 15 min. La temperatura del inyector y del detector fue de 250°C. Se empleó una relación de *split* 1:50 y se utilizó como gas portador helio con una presión de 11 psi.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las Tablas 2 y 3 se muestra la producción de CLA por parte de las cepas estudiadas, en condiciones de anaerobiosis y aerobiosis, respectivamente. Como se puede apreciar, en general, la mayor producción de CLA tuvo lugar en condiciones de anaerobiosis. En la mayoría de las cepas se registró una producción neta de este compuesto, si bien en algunos casos no sólo no se observó producción, sino que por el contrario, los microorganismos consumieron CLA durante el periodo de incubación de los medios. El isómero mayoritario en todas las cepas fue el c9:t11, que es el que se relaciona principalmente con los efectos beneficiosos del CLA en el organismo (Pariza, 2004).

En cuanto al tiempo de incubación, se observaron distintos perfiles de producción de CLA, independientemente de la tensión de oxígeno del medio. Así, algunas cepas como *Lactobacillus coryniformis* Q8 y *Enterococcus faecium* LM27 (Tabla 3) mostraron la máxima producción tras 24 horas de incubación, mientras que otras bacterias, como *Lactobacillus gasseri* LM21 necesitaron una incubación más prolongada (48 horas) para alcanzar la máxima producción de CLA (Tabla 2). Por lo que se refiere al tipo de producción (intra o extracelular), también se observaron distintos perfiles, no pudiéndose establecer en este caso patrones definidos.

La cepa que produjo la mayor cantidad de CLA entre todas las estudiadas fue *Lactobacillus gasseri* LM21, cuando se incubó en condiciones de anaerobiosis durante 48 horas (Tabla 2), presentando una producción total 63,90 µg/mL. En esta cepa, el 95% de la producción fue intracelular y la mayoría correspondió al isómero c9:t11. *Lactobacillus salivarius* HN6 produjo un total de 41,16 µg/mL de CLA a las 24 horas de incubación, también en condiciones de anaerobiosis (Tabla 2), y al igual que en el caso de la cepa LM21, la mayor parte tuvo un origen intracelular.

*Enterococcus faecium* LM27 cultivado en condiciones de aerobiosis fue la cepa que produjo la mayor cantidad de CLA extracelular (37,45 µg/mL), correspondiendo un 70% a la isoforma c9:t11 y un 30% al isómero t10:c12 (Tabla 3).

## CONCLUSIÓN

Por su capacidad de producción de CLA, algunas de las cepas estudiadas, como por ejemplo *Lactobacillus gasseri* LM21, podrían tener interés para su incorporación a productos funcionales. Estos estudios preliminares se tendrán que completar con ensayos en matrices alimentarias, en especial en relación con la supervivencia de las cepas durante el proceso de fabricación y el periodo de almacenamiento.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con el apoyo del Programa Alβan, beca nº E04D030224BR. Agradecemos al Dr. Juan Miguel Rodríguez, del Dpto. de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, la cesión de las cepas bacterianas objeto de este trabajo.

## BIBLIOGRAFIA

- Alonso, L.; Cuesta, E.P. y Gilliland, S.E. (2003). Production of free conjugated linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human intestinal origin. *Journal of Dairy Science*, 86, 1941-46.
- Ando, A., Ogawa, J., Kishino, S. y Shimizu, S. (2003). CLA production from ricinoleic acid by lactic acid bacteria. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 80, 889-894.
- Collomb, M., Schmid, A., Sieber, R., Wechsler, D., Ryhänen, E.L. (2006). Conjugated linoleic acids in milk fat: Variation and physiological effects. *International Dairy Journal* 16, 1347-1361.
- Chin, S.F.; Liu, W.; Storkson, J.M.; Ha, Y.L. y Pariza, M.W. (1992). Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *Journal of Food Composition and Analysis*, 5, 185-97.
- Hanson, S.W.F. y Olley, J. (1963). Application of the bligh and dyer method of lipid extraction to tissue homogenate. *Biochemical Journal*, 89, 101.

- Khanal, R.C. (2004). Potential health benefits of conjugated linoleic acid (CLA): A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 17, 1315–1328.
- Kim, Y.J. (2003). Partial inhibition of biohydrogenation of linoleic acid can increase the conjugated linoleic acid production of *Butyrivibrio fibrisolvens* A38. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4258-62.
- Kishino, S.; Ogawa, J.; Omura, Y.; Matsumura, K. y Shimizu, S. (2002). Conjugated linoleic acid production from linoleic acid by lactic acid bacteria. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79, 159-63.
- Martin, J.C. y Valeille, K. (2002). Conjugated linoleic acids: all the same or to everyone its own function? *Reproduction Nutrition Development* 42, 525–536.
- Ogawa, J.; Kishino, S.; Ando, A.; Sugimoto, S.; Mihara, K. y Shimizu, S. (2005). Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100, 355-64.
- Pariza, M.W. (2004). Perspective on the safety and effectiveness of conjugated linoleic acid. *American Journal of Clinical Nutrition* 79, 1132S-1136S.
- Parodi, P.W.(2004). Milk fat in human nutrition. *Australian Journal of Dairy Technology* 59, 3–59.
- Tricon, S., Burdge, G. C., Kew, S., Banerjee, T., Russell, J. J., Jones, E. L., Grimble, R.F., Williams, C.M., Yaqoob, P. y Calder, P.C. (2004). Opposing effects of cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 80, 614–620.
- Turpeinen, A.M., Mutanen, M., Aro, A, Salminen, I, Basu, S., Palmquist, D.L. y Griinari, J.M. (2002). Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans. *American Journal of clinical Nutrition* 76, 504-510.

**Tabla 1.** Origen de las cepas estudiadas

Cepa	Especie	Fuente
LM21	<i>Lactobacillus gasseri</i>	Leche humana
LC9	<i>Lactobacillus gasseri</i>	Leche humana
LC40	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Leche humana
HN6	<i>Lactobacillus salivarius</i>	Heces de niño
Q8	<i>Lactobacillus coryniformis</i>	Queso
LM24	<i>Enterococcus faecalis</i>	Leche humana
LM27	<i>Enterococcus faecium</i>	Leche humana
LJx4	<i>Enterococcus faecium</i>	Leche humana

**Tabla 2.** Producción extracelular e intracelular de los isómeros 9-cis,11-trans (c9:t11) y 10-trans,12-cis (10t:12c) de CLA ( $\mu\text{g/mL}$ ) por bacterias lácticas cultivadas en medio suplementado con ácido linoleico (0,02%) e incubadas en condiciones de anaerobiosis.

	Anaerobiosis									
	24 horas					48 horas				
	Extracelular		Intracelular		Total	Extracelular		Intracelular		Total
	c9:t11	t10:c1	c9:t11	t10:c		c9:t11	t10:c	c9:t1	t10:c1	
		2		12		12	1	2		
<i>Lactobacillus gasseri</i> LM21	0,28	-0,49*	1,09	-1,67	-0,79	3,31	-0,04	56,16	4,47	63,90
<i>Lactobacillus gasseri</i> LC9	12,39	12,11	-0,13	-2,38	21,98	9,66	-2,59	1,67	-2,67	6,06
<i>Lactobacillus fermentum</i> LC40	11,22	2,18	13,87	-2,76	24,51	13,40	7,64	-1,15	-3,11	16,78
<i>Lactobacillus salivarius</i> HN6	0,05	-2,80	33,04	10,87	41,16	7,41	-0,17	16,97	-2,00	22,22
<i>Lactobacillus coryniformis</i> Q8	7,63	0,20	1,71	-2,69	6,86	0,48	-2,43	-0,36	-2,97	-5,27
<i>Enterococcus faecalis</i> LM24	-0,18	-1,99	6,63	3,19	7,65	5,84	0,61	2,10	-1,38	7,16
<i>Enterococcus faecium</i> LM27	15,16	11,32	2,84	-0,87	28,46	16,77	7,72	-1,03	-3,32	20,14
<i>Enterococcus faecium</i> LJx4	-0,83	-2,49	3,22	4,37	4,27	5,18	0,94	-0,30	-2,32	3,50

\* los valores con símbolo negativo indican que los microorganismos consumieron CLA.

**Tabla 3.** Producción extracelular e intracelular de los isómeros 9-cis,11-trans (c9:t11) y 10-trans,12-cis (10t:12c) de CLA ( $\mu\text{g/mL}$ ) por bacterias lácticas cultivadas en medio suplementado con ácido linoleico (0,02%) e incubadas en condiciones de aerobiosis.

	Aerobiosis									
	24 horas					48 horas				
	Extracelular		Intracelular		Total	Extracelular		Intracelular		Total
	c9:t11	t10:c1	c9:t11	t10:c1		c9:t11	t10:c	c9:t11	t10:c1	
2		2			12		2			
<i>Lactobacillus gasseri</i> LM21	6,62	4,40	0,35	-2,74*	8,63	20,12	14,21	1,06	-2,85	32,54
<i>Lactobacillus gasseri</i> LC9	0,66	-0,77	0,57	-2,97	-2,52	-0,97	-2,75	7,35	-1,86	1,78
<i>Lactobacillus fermentum</i> LC40	0,90	-1,64	3,39	-0,69	1,96	8,05	5,97	1,15	-2,99	12,18
<i>Lactobacillus salivarius</i> HN6	1,45	-1,73	-0,53	-2,94	-3,74	6,51	-0,63	-1,74	-3,42	0,71
<i>Lactobacillus coryniformis</i> Q8	19,25	11,99	2,76	-1,76	32,24	2,22	-	6,47	-3,11	5,58
<i>Enterococcus faecalis</i> LM24	-0,22	-2,16	-1,16	-3,24	-6,78	2,73	-1,05	-0,63	-2,83	-1,77
<i>Enterococcus faecium</i> LM27	26,08	11,37	-0,58	-3,04	33,83	-0,56	-2,08	-1,71	-3,41	-7,75
<i>Enterococcus faecium</i> LJx4	12,03	2,07	5,25	-2,86	16,49	-1,11	-3,11	0,28	-2,31	-6,24

\* los valores con símbolo negativo indican que los microorganismos consumieron CLA.